

学校编码: 10384
学号: 22320121151334

密级_____

廈門大學

硕士学位论文

海洋沉积物中可降解孔雀石绿菌株和酶基
因的挖掘及其降解特性研究

Screening and Characteristics of Bacteria and Enzyme for
Degradation of Malachite Green from Marine Sediment

曲 武

指导教师姓名: 赵晶 副教授
专 业 名 称: 海 洋 生 物
论文提交日期: 2015 年 5 月
论文答辩时间: 2015 年 5 月

2015年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(赵晶)课题(组)的研究成果,获得(赵晶)课题(组)经费或实验室的资助,在(赵晶)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 曲武

2015 年 5 月 28 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：曲武

2015 年 5 月 28 日

目录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪论.....	1
1.1 海洋微生物简介.....	1
1.1.1 深海微生物.....	1
1.1.2 红树林沉积物微生物.....	3
1.2 孔雀石绿简介.....	4
1.2.1 孔雀石绿理化性质.....	4
1.2.2 孔雀石绿的应用.....	4
1.2.3 孔雀石绿毒性与生物体内的代谢.....	5
1.3 孔雀石绿的降解.....	7
1.3.1 物理吸附法.....	7
1.3.2 化学降解法.....	8
1.3.3 微生物降解法.....	8
1.3.4 酶降解法.....	9
1.4 功能微生物及基因筛选技术.....	10
1.4.1 微生物纯培养技术.....	10
1.4.2 宏基因组文库.....	12
1.4.3 宏基因组高通量测序技术.....	15
1.5 本论文的目的和意义.....	15
第二章 深海沉积物中孔雀石绿降解菌株的筛选及特性研究.....	17
2.1 材料与方法.....	17
2.1.1 深海沉积物样品采集.....	17
2.1.2 孔雀石绿降解菌株的富集、分离与纯化.....	17
2.1.3 可降解孔雀石绿菌株的鉴定.....	17
2.1.4 HMG1 降解孔雀石绿效率测定与孔雀石绿对其生长影响.....	19
2.1.5 HMG1 对孔雀石绿降解产物分析.....	19

2.1.6 HMG1 基因组高通量测序	20
2.1.7 降解孔雀石绿相关酶基因的原核表达.....	20
2.1.8 重组过氧化物酶(H-rPOD)对孔雀石绿降解特性的研究	24
2.1.9 重组过氧化物酶(H-rPOD)对孔雀石绿降解产物分析	25
2.2 结果与分析	25
2.2.1 降解菌株的分离、纯化与分子鉴定.....	25
2.2.2 HMG1 降解孔雀石绿效率测定与孔雀石绿对其生长影响	27
2.2.3 HMG1 基因组测序	29
2.2.4 重组过氧化物酶(H-rPOD)原核表达	32
2.2.5 重组过氧化物酶(H-rPOD)对孔雀石绿降解特性分析	35
2.2.6 菌株 HMG1 及 H-rPOD 对孔雀石绿降解中间产物、降解途径及机制 分析.....	39
2.3 讨论	44
第三章 深海沉积物宏基因组文库的构建	47
3.1 材料与方法	47
3.1.1 深海沉积物样品采集.....	47
3.1.2 深海沉积物中宏基因组 DNA 提取.....	47
3.1.3 大分子 DNA 片段的回收与纯化.....	48
3.1.4 插入 DNA 的末端补平	48
3.1.5 载体连接反应.....	49
3.1.6 体外包装.....	49
3.1.7 宏基因组文库的保存.....	50
3.1.8 宏基因组文库质量评估.....	51
3.1.9 深海沉积物宏基因组文库中可降解孔雀石绿相关酶基因的筛选...52	
3.2 结果与分析	52
3.2.1 深海沉积物宏基因组 DNA 提取.....	52
3.2.2 大分子 DNA 片段回收与纯化.....	53
3.2.3 深海沉积物宏基因组文库构建.....	54
3.2.4 深海沉积物宏基因组文库可降解孔雀石绿相关酶基因筛选.....55	

3.3 讨论	56
第四章 红树林沉积物宏基因组高通量测序与可降解孔雀石绿相关酶基因的筛选	59
4.1 材料与方法	59
4.1.1 红树林沉积物采集及环境总 DNA(eDNA)的提取	59
4.1.2 红树林沉积物宏基因组高通量测序	59
4.1.3 可降解孔雀石绿相关基因序列全长获取	60
4.1.4 Mgv-rPOD 对孔雀石绿降解特性研究	64
4.1.5 Mgv-rLACC 对孔雀石绿降解特性研究	65
4.1.6 Mgv-rP450 对孔雀石绿降解特性研究	65
4.2 结果与分析	66
4.2.1 红树林沉积物宏基因组高通量测序、分析	66
4.2.2 基于宏基因组信息的可降解孔雀石绿相关基因筛选	75
4.2.3 <i>mgv-laccase</i> 、 <i>mgv-p450</i> 基因序列分析	80
4.2.4 Mgv-rPOD、Mgv-rLACC、Mgv-rP450 克隆表达及对孔雀石绿降解特性分析	82
4.3 讨论	95
第五章 总结、不足与展望	98
5.1 总结	98
5.2 不足与展望	99
参考文献	100
附录 1	113
附录 2	120
附录 3	121
附录 4	123
附录 5	124

附录 6.....	125
附录 7.....	126
附录 8.....	128
附录 9.....	129
附录 10	130
附录 11.....	131
在学期间完成的文章及专利	132
致谢	133

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Literature Review	1
1.1 Microorganisms from marine sediment.....	1
1.1.1 Extremophiles in deep-sea sediments	1
1.1.2 Microbial community in mangrove sediments	3
1.2 Introduction to malachite green	4
1.2.1 Physicochemical properties of malachite green.....	4
1.2.2 Applications of malachite green.....	4
1.2.3 Toxicity and metabolic pathway of malachite green	5
1.3 Malachite green degradation	7
1.3.1 Physisorphtion.....	7
1.3.2 Chemical degradation	8
1.3.3 Microbial degradation.....	8
1.3.4 Enzyme degradation.....	9
1.4 Functional microorganism and genes screening	10
1.4.1 Pure culture	10
1.4.2 Metagenomic library	12
1.4.3 Metagenomic sequencing.....	15
1.5 Research purpose and significance.....	15
Chapter 2 microorganisms and enzyme related to malachite green	
degradation from deep-sea sediments	17
2.1 Materials and methods	17
2.1.1 Sample.....	17
2.1.2 Isolation of malachite green-degrading microorganism	17
2.1.3 Identification of malachite green-degrading microorganism.....	17

2.1.4 Detemination of malahite green degradation and viability of HMG1 ..	19
2.1.5 Intermediates of malachite green degradaion by HMG1	19
2.1.6 High throughput sequencing of HMG1 genome.....	20
2.1.7 Prokaryotic expression of H-rPOD	20
2.1.8 Characteristics of malachite green degradation by H-rPOD.....	24
2.1.9 Intermediates of malachite green degradaion by H-rPOD.....	25
2.2 Results	25
2.2.1 Identification of malachite green-degrading microorganism.....	25
2.2.2 Detemination of malahite green degradation and viability of HMG1 ..	27
2.2.3 High throughput sequencing of HMG1 genome.....	29
2.2.4 Prokaryotic expression of H-rPOD	32
2.2.5 Malachite green degradation characteristics of H-rPOD	35
2.2.6 Intermediates, mechanisms and pahway	39
2.3 Discussion.....	44
Chapter 3 Construction of metagenomic library from deep-sea	
sediments	47
3.1 Materials and methods	47
3.1.1 Sample.....	47
3.1.2 Extraction of DNA in deep-sea sediment microbial	47
3.1.3 Extraction and purification of DNA	48
3.1.4 End-repairing	48
3.1.5 Ligation	49
3.1.6 Package <i>in vitro</i>	49
3.1.7 Conservation	50
3.1.8 Quality assessment.....	51
3.1.9 Scanning of MG-degrading genes in metagenomic library	52
3.2 Results	52
3.2.1 DNA extraction.....	52
3.2.2 DNA purification	53

3.2.3 Metagenomic library construction	54
3.2.4 Scanning of MG-degrading genes in metagenomic library	55
3.3 Discussion.....	56
Chapter 4 Metagenomic sequencing of mangrove sediments and screening of MG-degrading genes.....	59
4.1 Materials and methods	59
4.1.1 Sample and extraction of environment DNA.....	59
4.1.2 Metagenomic sequencing.....	59
4.1.3 Full-length amplification of MG-degrading genes	60
4.1.4 Degradation characteristics of Mgv-rPOD	64
4.1.5 Degradation characteristics of Mgv-rLACC.....	65
4.1.6 Degradation characteristics of Mgv-rP450	65
4.2 Results	66
4.2.1 Metagenomic sequencing of mangrove eDNA.....	66
4.2.2 Scanning of MG-degrading genes	75
4.2.3 Full-length amplification of <i>mgv-laccase</i> and <i>mgv-p450</i>	80
4.2.4 Purification and degradation characteristics study of Mgv-rPOD, Mgv-rLACC and Mgv-rP450	82
4.3 Discussion.....	95
Chapter 5 Summary, shortage and outlook.....	98
5.1 Summary.....	98
5.2 Shortage and outlook.....	99
References.....	100
Appendix 1.....	113
Appendix 2.....	120
Appendix 3.....	121
Appendix 4.....	123

Appendix 5	124
Appendix 6	125
Appendix 7	126
Appendix 8	128
Appendix 9	129
Appendix 10	130
Appendix 11	131
Publications and patent	132
Acknowledgements	133

厦门大学博士论文摘要库

摘要

孔雀石绿是一种三苯基甲烷类染料,广泛应用于水产、纺织、造纸等产业,导致水生环境化学需氧量(COD)和生物需氧量(BOD)大幅提高,阻挡光的透射,严重影响水生生物的生长,同时其毒性和致癌性也会通过食物链传递给人类及其他陆生生物。本研究以深海和红树林沉积物中微生物为研究对象,采用富集培养和宏基因组技术对可降解孔雀石绿的微生物及功能基因资源进行挖掘,并对其降解途径及代谢产物进行研究,为近海环境修复提供潜在的、可应用的生物资源。

本研究自太平洋深海沉积物中分离得到一株可高效降解孔雀石绿的海洋细菌 *Tenacibaculum mesophilum* HMG1,其孔雀石绿降解效率可以在 12 h 内达到 98.82%;通过全基因组测序分离得到一种过氧化物酶基因——*h-peroxidase*,同时发现其原核表达产物 H-rPOD 可以在 4 h 内降解高达 1000 mg/l 的孔雀石绿;LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)分析结果表明,孔雀石绿经菌株 HMG1 降解后的中间产物,分别为 desmethyl-MG (m/z 315)、4-(dimethylamino) benzophenone (m/z 226)和 4-(methylamino) benzophenone (m/z 212);孔雀石绿经 H-rPOD 降解后,形成了 5 种中间产物,分别为 didesmethyl-MG (m/z 302)、hydroxyl-MG (m/z 346)、(hydroxyl) didesmethyl-MG (m/z 318)、Michler's ketone (m/z 269)和 N,N-dimethylaniline (m/z 122);通过以上中间产物推测出孔雀石绿的生物降解途径,其化学反应机制与亲核进攻相关。同时,研究表明 H-rPOD 在成分复杂的环境中对孔雀石绿仍具有高降解活性,金属离子、金属螯合剂、盐度等因素对 H-rPOD 的降解效率均无明显抑制作用。

本研究构建了深海沉积物微生物 Cosmid DNA 宏基因组文库,该文库的 DNA 平均插入片段大小为 35 kb 左右,其滴度为 9.22×10^4 pfu/ml,共包含 51632 个克隆,该宏基因组文库共含有 1.77 GB 的数据量,可以覆盖 84 株类似大肠杆菌总基因组(其总基因组为 4.7 MB)的微生物,且覆盖率达到 99%,为包含孔雀石绿降解功能在内的各种功能基因的筛选提供了丰富的基因资源。

本研究通过 Illumina Hiseq2500 对红树林沉积物宏基因组进行高通量测序,得到了 10 GB 的数据。通过 BLAST 比对筛选获得 46 条可能与孔雀石绿降解相关的基因,分属于过氧化物酶(POD)、漆酶(LACC)和细胞色素氧化酶 P450(CYP)

三大类基因,其中 POD 基因占绝大部分,丰度达到 93.54%;其次是 LACC 基因,丰度为 0.34%; CYP 基因丰度最小,只有 0.31%。本文分别选取三类基因中与已知序列同源性较低的基因进行原核表达(*mgv-peroxidase*、*mgv-laccase* 和 *mgv-p450*)并验证其重组蛋白(Mgv-rPOD、Mgv-rLACC 和 Mgv-rP450)的孔雀石绿降解活性。其中 Mgv-rPOD 可以在 40 min 内降解浓度为 300 mg/l 的孔雀石绿,降解效率可达 97.3%;而 Mgv-rLACC 和 Mgv-rP450 的降解活性较弱,分别可以降解 63.7%和 54.1%的孔雀石绿(浓度为 20 mg/l),二者所需的降解时间也较长,需要消耗 24 h。Mgv-rPOD 对包括金属离子、EDTA、盐度、低温等外界环境的影响具有较强的抗性,同时其降解所需的辅因子 H₂O₂ 也相对廉价,因此 Mgv-rPOD 具有可降解孔雀石绿的潜在应用价值。

关键词: 海洋沉积物; 孔雀石绿; 嗜中温黏着杆菌; 宏基因组; 酶; 原核表达

Abstract

Malachite Green (MG) is a type of triphenylmethane dye. It is extensively used as a drug in the aquaculture industry and as a dye in the textile industry. The effluents with MG are colored and highly increase the biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD) of aquatic ecosystems. The dye released without any treatments seriously inhibits viability and development of aquatic animals and plants by blocking sunlight penetration, and then transferring into human by the food chain. However, MG is still used due to its low cost and high efficacy against fungi and protozoa. In this study, we aim to discover marine microorganisms and enzymes degrading MG from mangrove and deep sea sediments using culture-dependent and -independent methods. Meanwhile, by studying the MG-degrading characteristics of bacteria and enzymes, we could provide potential and valuable bioresource from marine environmental remediation.

One strain isolated from Pacific sediment, identified as *Tenacibaculum mesophilum* HMG1, was the first marine bacterium with strong MG-degrading activity. It was capable of efficiently removing 98.82% of MG within 12 h and grew vigorously at a concentration of 20 mg/l MG. A *peroxidase* gene found in the genome of strain HMG1 was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells, and the recombinant peroxidase (rPOD) was able to degrade MG at a concentration of 1000 mg/l. The primary pathway of MG degradation by strain HMG1 and rPOD was inferred based on common candidate intermediates detected by LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry), including desmethyl-MG (m/z 315), 4-(dimethylamino) benzophenone (m/z 226), and 4-(methylamino) benzophenone (m/z 212). Besides that, due to the presence of other candidate intermediates, including didesmethyl-MG (m/z 302), hydroxyl-MG (m/z 346), (hydroxyl) didesmethyl-MG (m/z 318), Michler's ketone (m/z 269), N,N-dimethylaniline (m/z 122) and MG (m/z 329), rPOD might possess another MG degradation pathway. H-rPOD also tolerated different conditions, such as metal ions, metal chelator and

salinity, which considered as a good choice to remove MG in complex wastewater.

One metagenomic library was constructed from Pacific deep-sea sediment. The metagenomic library has a titer of 9.22×10^4 pfu/ml, and contained 51632 clones. The library involved 1.77 GB data which could cover 84 microorganism genomes similar to *E. coli* genome (the total genome 4.7 MB) with a coverage rate of 99%. This library would provide diverse and abundant microbial information for functional genes screening in the future.

We also explored MG-degrading genes (MDGs) from Chinese mangrove sediments using metagenomics sequencing. 10 GB data and 33756 contigs was obtained among those sequences, 46 putative MDGs were discovered and belong to three kinds of enzyme, including *peroxidase* genes (93.54% of total MDGs), *laccase* (0.34%) and *p450* (0.31%). Three MDGs, *mgv-laccase*, *mgv-peroxidase* and *mgv-p450*, were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells to verify the MG-degrading activity. All the three recombinant proteins, Mgv-rLACC, Mgv-rPOD and Mgv-rCYP, showed MG-degrading activities. Mgv-rPOD has the most remarkable efficiency and could decolorize 97.3% of MG (300 mg/l) within 40 min. In addition, 63.7% and 54.1% of MG (20 mg/l) were removed by incubating with Mgv-rLACC and Mgv-rCYP within 24 h, respectively. The comparative analysis showed that Mgv-rPOD had strong adaptability to metal ions (except Cu^{2+}), metal-chelator, salinity, low temperature and variable pH. These characteristics made Mgv-rPOD better to remove MG from complex marine environment.

Keywords : Marine Sediments; Malachite Green; *Tenacibaculum mesophilum*; Metagenomics; Enzyme; Prokaryotic Expression

第一章 绪论

1.1 海洋微生物简介

海洋是一种开放而多变的生态环境，也正是由于这种复杂的特性，海洋中孕育了丰富的生物资源，而海洋微生物是其中非常重要的成员之一。海洋微生物对生态环境中物质循环、能量产生及生态平衡等方面起到至关重要的作用^[1]。同时，受到海洋环境低温、寡营养等因素的影响，海洋微生物进化出了独特的生理特性，为药物开发^[2]、工业生产^[3]、环境治理^[4]等方面提供良好的生物资源。

海洋微生物的分布很广。海水、礁石、沉积物及海洋动、植物体内外均有海洋微生物的分布，而海洋沉积物中微生物含量及多样性尤为丰富，可以占到全球原核生物量的 65%^[5,6]。Sogin 等^[7]采用大规模平行标签测序策略对北大西洋的扩散流热液口微生物群落多样性进行调查，发现其细菌种类比之前报道的文献要多出一至两个数量级，但细菌的数量却非常稀少，组成了一个“稀有生物圈”(Rare Biosphere)，这些微生物之间存在较大的遗传距离，可能在地球形成的不同时期起到了至关重要的作用。海洋微生物不仅多样性丰富，而且还有许多菌株具有特殊的酶基因，如氨肽酶^[8]、醇脱氢酶^[9]、纤维素酶^[10]、酯酶^[11]、环氧化物水解酶^[12]等。由此可见，海洋微生物是非常重要且丰富的基因库。

1.1.1 深海微生物

深海地区长期处于低温、高压、寡营养的环境条件下，生物生存条件严苛，但尽管如此，在深海中仍旧存在丰富的微生物资源，而我们将这些可以在极端自然环境(高温、高压、低温、强酸、强碱和高盐等)下存活、生长和繁殖的生物称为极端生物(Extremophile)。研究表明，从海水表面到一万米以下的深海都发现有微生物的存在，甚至发现海底软泥 800 米以下的地方存在微生物，而这些微生物有着 1500 万年的历史^[13]。

由于深海处于黑暗的环境中，不能通过光合作用来提供有机营养物质，因此深海微生物的部分营养依赖于真光层初级生产者，而上层水域产生的有机物只有 2%左右能够沉降到达海底，这些有机物往往属于难降解的物质^[14]。这也证明，

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.